

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ $Mn^{2+}$ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ В КУЛЬТУРЕ

О.Н. Жук, В.Н. Никандров

*Полесский государственный университет,*

*Институт физиологии НАН Беларуси, Беларусь; E-mail: nadulich@mail.ru*

Марганец является истинным незаменимым биоэлементом. Поступая в организм человека и животных, он концентрируется в тканях, богатых митохондриями, способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Этот элемент входит в состав митохондриальных супероксиддисмутазы, пируваткарбоксилазы, а также глутаминсинтетазы, катализирует образование связи глюкозамин-серин при синтезе глюкозамингликанов хряща, является кофактором окислительного фосфорилирования. Образуя устойчивые комплексы с адениловыми нуклеотидами, марганец участвует в реализации каталитической функции таких энзимов как аденилаткиназа, аргининкиназа, фосфоэнлпируваткарбоксилаза, креатинкиназа, глутаматдегидрогеназа, энлаза, изоцитратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, пентозоизомеразы (Доклад ВОЗ, 1985; В.Е. Зайчик, Н. Агаджанян, 2004; K. Zablocka-Slowinska, H. Grajeta, 2012; T.E. Gunter et al., 2013).

Почвы, растительность и продукты питания Республики Беларусь характеризуются недостаточным уровнем этого микроэлемента. Так, при обследовании более 30 скотоводческих хозяйств Беларуси в крови крупного рогатого скота установлено в 96,2% случаев низкое содержание марганца (М.Н. Кучинский, 2010).

Вместе с тем, избыточное поступление марганца в организм человека и животных вызывает ряд патологических сдвигов с типичными признаками поражения центральной нервной системы, включая дегенеративные изменения в полосатом теле, бледном ядре и черной субстанции головного мозга (J. Ebany et al., 2013; M. Farina et al., 2013; M. Sidorik-Węgrzynowicz, 2013; и другие). Очаги поражения наблюдались также в гипоталамусе, коре, мозжечке и стволе головного мозга. Интоксикация марганцем у животных вызывает повреждение части нейронов и резко выраженный глиоз. Психические и неврологические симптомы при интоксикации марганцем схожи с таковыми при экстрапирамидных нарушениях, например при паркинсонизме. Полагают, что это обусловлено снижением уровня дофамина и, вероятно, серотонина. Механизмы нейротоксичности марганца полностью не расшифрованы. Показано, что этот элемент вызывает оксидативный стресс – один из главных факторов в увеличении проницаемости биомембран, включая митохондриальные, что, в свою очередь, ведет к коллоидному осмотическому набуханию матрикса самих клеток и матрикса митохондрий. Предполагают, что этим обусловлена дисфункция митохондрий, ведущая к угнетению окислительного фосфорилирования.

Избыточное поступление марганца в организм человека и животных наблюдается вблизи металлургических производств, при сварке, производстве сухих гальванических элементов, производстве и использовании соединений марганца для обработки пищевых сельскохозяйственных культур фунгицидами. Его производное широко используется как антидетонационная присадка в бензине, нередко марганец в повышенных концентрациях присутствует в напорных подземных водах Беларуси. Кроме того, описан ряд случаев отравления детей растворами перманганата калия.

Цель настоящей работы – установить особенности влияния ионов  $Mn^{2+}$  на клетки культуры неокортекса новорожденной крысы, клетки крысиной глиомы С6 и их протеолитическую активность.

Исследования проведены на органотипических и диссоциированных культурах коры головного мозга новорожденных крыс и на перевиваемой клеточной линии крысиной глиомы С6. Все культуры выращены в синтетической питательной среде ДМЕМ (Sigma, США), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки крови (ТС, Sigma, США) в  $CO_2$ -инкубаторе "HeraCell" (Швейцария) при 37 °С в атмосфере 5%  $CO_2$  и 95% воздуха. Смену питательной среды проводили 1 раз в 2–3 сут.  $MnCl_2$  ( $10^{-1}$ – $10^{-6}$  М) добавляли в питательную среду, содержащую 10% ТС. Время наблюдения 1–14 суток *in vitro*. Количество исследованных культур в каждой серии составило  $\geq 10$ .

На культурах неокортекса новорожденной крысы установлено, что добавление  $\text{MnCl}_2$  в концентрациях  $10^{-1}$ – $10^{-3}$  М уже через 24 ч сопровождалось необратимыми изменениями структуры клеток нервной ткани – сжатием и зернистостью цитоплазмы, утратой отростков нейронами и клетками глии и полной гибелью клеток. Со снижением концентрации  $\text{MnCl}_2$  в ростовой среде уменьшалось и его токсическое действие. Так, при концентрации этой соли  $10^{-6}$  М уже через 90 мин наблюдалось увеличение размеров клеток на 33,6% (за счет набухания) и увеличению межклеточных пространств, а через 24 ч увеличивалась доля двудерных клеток, в цитоплазме некоторых клеток появлялись мелкие вакуоли и жировые включения.

В культурах клеток глиомы С6 при концентрации  $\text{MnCl}_2$   $10^{-6}$  М наблюдались сжатие и гибель клеток, на 64% уменьшалась длина их отростков, уменьшалась их арборизация. Изменялось и внутриклеточное распределение витального красителя – нейтрального красного: в клетках контрольных культур краситель, в основном, локализовался в приядерной зоне, тогда как при воздействии марганца – по всей цитоплазме или же отсутствовал в клетках.

Судя по данным литературы, обращает на себя внимание практически отсутствие материалов о влиянии ионов  $\text{Mn}^{+2}$  на состояние звеньев одного из важнейших гомеостатических механизмов – протеолиза. Имеются лишь фрагментарные сообщения о присутствии ионов  $\text{Mn}^{+2}$  в карбоксипептидазах и лейцинаминопептидазе, не создающие сколько-нибудь целостной картины, а также о влиянии *in vitro*  $\text{MnCl}_2$  на казеинолитическую и гемоглинолитическую активность трипсина, химотрипсина и папаина (В.Н. Никандров и соавт., 2014).

Уровень АТФ-активируемого протеолиза в клетках глиомы С6 при воздействии  $\text{MnCl}_2$  в концентрации  $10^{-4}$  М (но не  $10^{-6}$  М) статистически значимо возрастал через 20 мин и 24 ч на 22 и 14% соответственно. Однако наиболее резкие изменения наблюдались со стороны  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза в этих клетках. Так, уровень  $\text{Ca}^{2+}$ -I(мкМ)-протеолиза через 20 мин и 24 ч увеличился при действии  $\text{MnCl}_2$  в концентрации  $10^{-4}$  М на 31 и 71% соответственно, тогда как  $\text{Ca}^{2+}$ -II(мМ)-протеолиза – на 57 и 59%. При концентрации  $\text{MnCl}_2$   $10^{-6}$  М уровень  $\text{Ca}^{2+}$ -I(мкМ)-протеолиза возрос в указанные интервалы времени на 68 и 46%, а  $\text{Ca}^{2+}$ -II(мМ)-протеолиза – на 35 и 46%.

Следовательно, в указанном диапазоне концентраций  $\text{MnCl}_2$  оказал выраженное деструктивное действие на клетки нервной ткани культур неокортекса и глиомы С6, уменьшающееся при снижении концентрации эффектора. Даже в минимальной концентрации при короткой экспозиции существенно возрастал уровень обеих форм  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза, реакции которого в определенных ситуациях, судя по данным литературы, способны участвовать в разрушении структур клетки. Однако изложенных данных недостаточно для исчерпывающего объяснения особенностей токсического действия ионов  $\text{Mn}^{2+}$ , раскрытие всех сторон которого требует проведения широкого спектра дальнейших исследований. Авторы выражают благодарность Р.И. Гронской, Е.Ф. Полукошко и М.К. Тумилович за оказанную помощь в работе.